

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)



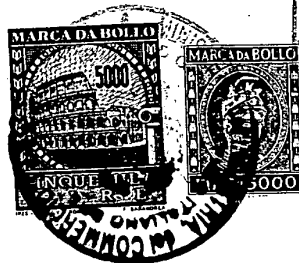
PCT/IT98/00231

Mod. C.E. - 1-4-7

09/486660

MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

DIREZIONE GENERALE DELLA PRODUZIONE INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI



REC'D 8 DEC 1998

WIPO

PCT

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per

INV. IND.

N. MI97 A 001972

*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito*

**PRIORITY
DOCUMENT**

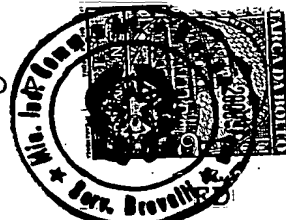
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

L. 10 OTT. 1998

Roma, li

IL DIRETTORE DELLA DIVISIONE

D.ssa Maria Luisa FOCA



A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione **CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE**
Residenza **Roma** codice
2) Denominazione
Residenza codice

00962421004

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome e nome **Bianchetti Giuseppe ed altri** cod. fiscale
denominazione studio di appartenenza **Studio Consulenza Brevettuale s.r.l.**
via **Rossini** n. **8** città **Milano** cap **20122** (prov) **MI**

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via n. città cap (prov)

D. TITOLO

classe proposta (sez/ct/sci)

C12N

gruppo/sottogruppo

15 00

"Animali transgenici per lo studio di agenti tossici chimici, fisici o biologici"

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI NO **X**

SE ISTANZA: DATA

N° PROTOCOLLO

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

1) **Sacco Maria Grazia**
2) **Zecca Luigi**

3) **Bromley Peter**
4) **Roncucci Romeo**

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domande

data di deposito

allegato
S/R

SCIoglimento RISERVE

Data

N° Protocollo

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI



DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) **1** PROV n. pag. **24** riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)
Doc. 2) **1** PROV n. tav. **04** disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)
Doc. 3) **1** RIS lettera d'incarico, protetto o non protetto (obbligatorio se presente)
Doc. 4) **0** RIS designazione inventore
Doc. 5) **0** RIS documenti di priorità con traduzione in italiano
Doc. 6) **0** RIS autorizzazione o atto di cessione
Doc. 7) **0** nominativo completo del richiedente

SCIoglimento RISERVE

Data

N° Protocollo

8) attestati di versamento, totale lire

cinquecentosessantacinquemila#

obbligatorio

COMPILATO IL **28 08 1997**

FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I)

Minoja Fabrizio

CONTINUA S/NO **SI**

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA S/NO **SI**

codice **15**

UFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI

MILANO

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

MI97A 001972

Reg. A

L'anno millenovecento

NOVANTASETTE

, il giorno

VENTOTTO

, del mese di

AGOSTO

il (i) richiedente (i) sopraindicato (i) ha (hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredate di n. **01** fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraportato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIO ROGANTE.

IL DEPOSITANTE

Stefano Scacchi

timbro
dell'ufficio

L'UFFICIALE ROGANTE
CORTONESI MAURIZIO

Foglio aggiuntivo n. 01 di totali

DOMANDA N.

1197A00172

REG. A

AGGIUNTA MODULO A

N.G.

A. RICHIEDENTE (I)

Denominazione		
Residenza		codice
Denominazione		
Residenza		codice
Denominazione		
Residenza		codice
Denominazione		
Residenza		codice
Denominazione		
Residenza		codice
Denominazione		
Residenza		codice

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome	cognome nome
05 Clerici Libero A.	
06 Vezzoni Paolo	

F. PRIORITA

nazione o organizzazione	tipo di priorit	numero di domanda	data di deposito	allegato S/R	SCIOGLIMENTO RISERVE Data N° Protocollo

FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I)

Minoja Fabrizio

Fabrizio Minoja

SPAZIO RISERVATO ALL'UFFICIO CENTRALE BREVETTI

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA

M197A001972

REG. A

DATA DI DEPO

28.08.1997

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

/ /

D. TITOLO

"Animali transgenici per lo studio di agenti tossici chimici, fisici o biologici"

L. RIASSUNTO

L'invenzione si riferisce ad animali transgenici non umani recanti all'interno di alcune o di tutte le loro cellule sequenze di DNA regolatrici sensibili ad agenti tossici chimici, fisici o biologici, collegate a sequenze di geni "reporter", utili per studi di tossicologia.



M. DISEGNO

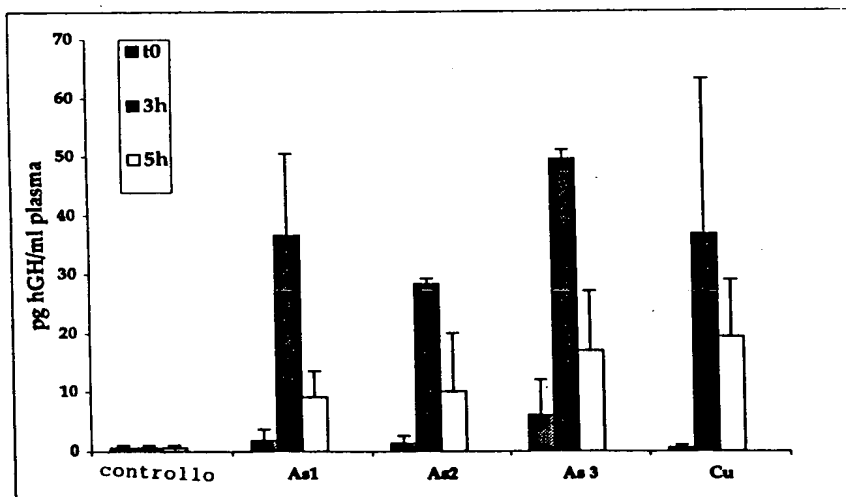


FIGURA 4

5195 M Descrizione dell'invenzione industriale avente per titolo:

PB/ac "ANIMALI TRANSGENICI PER LO STUDIO DI AGENTI TOSSICI CHIMICI, FISICI O BIOLOGICI"

a nome: CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE

28 AGO. 1997

con sede in: Roma

* * *

MI 97 A 1972

La presente invenzione si riferisce a animali transgenici per lo studio di agenti tossici chimici, fisici o biologici.

Attualmente le prove di tossicità possono essere condotte sia in vitro che in vivo.

Vi è un grande interesse da parte dell'industria, dell'opinione pubblica e della comunità scientifica nell'abolizione delle prove di tossicità effettuate sugli animali e nella loro sostituzione con prove in vitro.

Questo obiettivo è del tutto irrealistico al momento attuale, in quanto non sono imminenti prove in vitro che possano sostituire quelle in vivo.

E' noto infatti che in vivo le sostanze in esame spesso sono soggette a svariate modifiche metaboliche che possono alterarne notevolmente il profilo di tossicità, in maniera del tutto imprevedibile in vitro.

D'altra parte gli studi in vivo comportano spesso sofferenze e il sacrificio di un grande numero di animali.

E' tuttavia possibile ideare modelli animali, geneticamente ingegnerizzati, che possano semplificare la determinazione della

tossicità di agenti di varia natura.

Di recente è stato considerato l'impiego di animali transgenici come modelli per studi di farmacologia.

EP 0 169 672 B1 descrive ad esempio animali transgenici recanti oncogeni come c-myc, adatti per lo studio dei tumori legati all'espressione di tali oncogeni, o recanti il gene dell'ormone della crescita umano fuso con il promotore della metallotioneina, in cui, essendo detto promotore inducibile, è possibile studiare l'effetto sull'organismo in toto dell'espressione, in seguito ad induzione, della proteina il cui gene è ad esso associato (Palmiter et al. (1983) Science 222, 809).

WO 91/15579 riporta un metodo per effettuare studi di mutagenesi su animali transgenici recanti sequenze di DNA facilmente estraibili ed analizzabili per eventuali mutazioni in esse presenti.

La presente invenzione fornisce animali transgenici non umani utili per studi di tossicologia.

Tali animali sono caratterizzati per il fatto di possedere all'interno di alcune o di tutte le loro cellule delle sequenze di DNA regolatrici, sensibili ad agenti tossici chimici, fisici o biologici, collegate a sequenze di geni "reporter", in modo tale che l'espressione di questi ultimi sia controllata/indotta da dette sequenze regolatrici.

Tra le sequenze regolatrici sono preferite quelle dei promotori "da stress", quali possono essere i promotori delle "heat shock proteins" (hsp), ma si possono citare anche quelli dei citocromi della superfamiglia dei p450 e quelli di altri geni attivati da stress fisici,

chimici o biologici come ad esempio la p53.

Tra i geni "reporter" opportunamente impiegabili figurano, oltre al gene dell'ormone della crescita che è stato utilizzato negli esperimenti più avanti descritti, anche i geni per la cloramfenicolo acetil transferasi (CAT), della proteina a fluorescenza verde (GFP), della beta-galattosidasi (LacZ).

Gli animali transgenici dell'invenzione possono così essere utilizzati in un metodo per lo studio dell'azione tossica esercitata da agenti di diversa natura e provenienza.

Per quanto riguarda gli animali, in teoria, può venire impiegato qualsiasi animale adatto per un test di tossicità, in pratica sono preferiti mammiferi non umani, in particolare primati e roditori. Particolarmente preferiti sono i topi.

I metodi utilizzabili per produrre gli animali transgenici sono quelli convenzionali, che possono includere per esempio l'introduzione (microiniezione) del DNA ricombinante in cellule embrionali o in pronuclei di cellule di embrioni allo stadio di 1-cellula, l'infezione dello zigote, di cellule di embrioni, di cellule somatiche o di tessuti dell'animale con virus, in particolare con retrovirus, secondo quanto descritto, per esempio, in Hogan et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1986; Palmiter et al., Ann. Rev. Genet., 20: 465-499; 1986; Capecchi, Science, 244: 288-292, 1989.

Il metodo per saggiare in vivo i tossici potenziali secondo la presente invenzione comprende l'esposizione dell'animale all'agente chimico o fisico per un tempo sufficiente a indurre l'attivazione della

risposta, e la misura con un metodo semplice dei valori di espressione del gene "reporter". Nel caso tale gene codificasse per una proteina secreta nel sangue, ad esempio, si potrebbero rilevare la sua concentrazione ematica o eventuali altri parametri chimico-clinici variabili in funzione della risposta ottenuta in seguito ad attivazione del promotore "da stress".

Una realizzazione preferita di questo primo aspetto dell'invenzione consiste nella produzione di topi transgenici in cui è stato introdotto un costrutto costituito dalla fusione del promotore delle hsp con il gene per l'ormone della crescita (GH) (transgene), detto promotore essendo descritto tra l'altro, in Dreano et al. (Biotechnology 1988 e Gene 49::1-8, 1986) e in Fischbach et al. (Cell Biol. 1993: 9:177-188, 1993). In quest'ultimo lavoro, in particolare, si descrive come l'esposizione a metalli tossici di una linea stabilizzata fibroblastica, ingegnerizzata con un costrutto contenente l'ormone della crescita sotto il controllo del promotore di una hsp, possa provocare la secrezione del gene reporter nel terreno di cultura.

Secondo la realizzazione appena menzionata, l'insulto dell'agente tossico viene rilevato come incremento del livello plasmatico di GH rispetto al controllo.

Questo modello si è rivelato particolarmente efficace e sensibile, specialmente verso agenti tossici del gruppo dei metalli, ma può essere opportunamente impiegato anche per altre classi di composti tossici chimici quali ad esempio, gli "endocrine disruptors", nonché per altri agenti fisici o biologici quali i campi elettromagnetici e le



radiazioni.

I vantaggi derivanti dall'invenzione comportano la possibilità di alleviare le sofferenze dell'animale, dato che vengono generalmente impiegate dosi basse delle sostanze da valutare, sicuramente inferiori a quelle che potrebbero indurre la sofferenza o la morte degli animali, la riduzione del numero degli animali impiegati per le valutazioni tossicologiche, e la disponibilità di un modello assolutamente attendibile per quello che riguarda le modificazioni metaboliche cui è soggetto il tossico nell'organismo, le sue interazioni con i diversi distretti organici e gli effetti finali sulle cellule, compresi quelli cronici. Detto modello si presta in particolare per prove reiterate nel tempo, e permette di monitorare l'effetto dell'agente nel corso di trattamenti prolungati, sempre impiegando lo stesso animale, eliminando così la variabilità della risposta individuale. Inoltre lo stesso animale può essere esaminato per più di un composto. Infine, tali modelli transgenici possono essere usati anche per lo studio in vivo della cinetica della tossicità dei composti tossici.

Il secondo aspetto dell'invenzione riguarda la possibilità di ottenere colture primarie di cellule di vari tessuti dell'animale transgenico ottenuto come descritto in precedenza, nelle quali cellule è integrato il costrutto di DNA ricombinante, in modo tale che possa essere condotto uno studio di tossicità tessuto- o cellula-specifico, e possano essere valutati in condizioni controllate e in maggior dettaglio i parametri biochimici intracellulari interessati dall'azione tossica dell'agente, nelle diverse fasi di sviluppo dell'animale.

In questo caso il metodo per attuare i saggi in vitro comprende la preparazione della coltura primaria in opportune condizioni, variabili a seconda del tipo di cellula considerata, l'esposizione di detta coltura all'agente tossico, e il monitoraggio dell'attivazione del promotore "da stress" attraverso la rilevazione del prodotto del gene "reporter".

Riferendosi ai topi transgenici recanti il costrutto hsp/GH descritti in precedenza, una possibile realizzazione di quest'ultimo aspetto dell'invenzione consiste, per esempio, nella produzione di colture primarie di fibroblasti, cellule di rene, cellule di polmone, cellule di midollo osseo, epatociti ed altri, nel loro trattamento con uno o più agenti tossici, contemporaneamente o in tempi diversi, e nella determinazione del GH secreto nel terreno di coltura.

Nel caso un tessuto o un tipo cellulare risultassero sensibili all'azione del tossico secondo il metodo appena descritto, si potrebbe procedere alla ulteriore indagine biochimica tesa a svelare quali vie cellulari sono particolarmente interessate dall'azione tossica rilevata.

Pertanto l'invenzione riguarda anche un metodo per attuare prove di tossicità in vitro su colture primarie di cellule somatiche dell'animale transgenico descritto in precedenza, così come le cellule stesse.

BREVE DESCRIZIONE DELLE FIGURE

Fig. 1: Pannello A: Analisi per "Southern blot" di topi transgenici eterozigoti (corsie 1-4) e omozigoti (corsie 5-7) e di un topo non transgenico di controllo (corsia 8).

Pannello B: RT-PCR di cellule di fegato di topi transgenici attivate da shock termico, con "primers" specifici per hGH.

Campioni: RNA da epatociti coltivati prima (corsia 1) e 30 min. dopo (corsia 2) lo shock termico in vitro;

RNA da fegati prima (corsia 3) e 30, 60, 90 minuti dopo shock termico (corsie 4-6). + e - rappresentano rispettivamente i controlli negativi e positivi. Le corsie da 7 a 10 sono le amplificazioni su RNA di fegato non retrotrascritto effettuate sugli stessi campioni delle corsie da 3 a 6. M1 : "marker" V, M2: scala da 1 Kb.

Pannello C: RT-PCR con primers HPRT specifici condotta su RNA dei campioni da 1 a 6 come nel pannello B.

Fig. 2: livelli plasmatici di hGH ("human growth hormone") misurati a tempi diversi in topi transgenici dopo stress termico. I valori rappresentano la media \pm SE (errore standard); il numero di topi esaminati per ciascun periodo di tempo è indicato dal numero sopra ciascuna barra.

Fig. 3: livelli medi di hGH plasmatico in pg/ml \pm SE osservati nei topi transgenici iniettati intraperitonealmente con PBS e con vari tossici inorganici alle dosi indicate. Oltre ai controlli vengono indicati:

Rb = rubidio cloruro; Hg = metilmercurio cloruro; Cu = rame solfato; Cd = cadmio cloruro; As; sodio arsenito (2 dosi) (sotto ogni sbarra è indicato il numero dei topi testati).

I livelli di significatività sono :

*p < 0,05 - **p < 0,01 - ***p < 0,005.

Fig. 4: media \pm SE dei livelli plasmatici dell'ormone hGH osservati in topi transgenici sottoposti a due trattamenti successivi, secondo lo schema di seguito riportato:

Gruppo	Primo trattamento (T_1)	Secondo trattamento (T_2)	Tempo T_1-T_2
AS ₁	As	As	10 gg
AS ₂	Cd	As	2 mesi
AS ₃	Rb	As	2 mesi
Cu	Cu	Cu	2 mesi
Controllo	non trattato	non trattato	



Gli esempi che seguono servono a chiarire meglio l'invenzione:

ESEMPIO 1

- Produzione e caratterizzazione di una linea di topi transgenici.

I topi transgenici sono stati prodotti secondo tecniche standard (Hogan et al., "Manipulating the mouse embryo : a laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986), microiniettando nei pronuclei di embrione allo stadio di 1 cellula un frammento di 1,4 kb EcoRI DNA da un costrutto p17 hGH (descritto in Dreano et al., vedi sopra), contenente cDNA dell'ormone della crescita umano come gene "reporter" fuso con la regione di controllo del promotore umano di hsp 70.

I topi sono stati screenati per Southern blot e/o PCR condotti su DNA estratto dalle code degli animali secondo tecniche standard.

La reazione PCR è stata condotta con i seguenti primers:

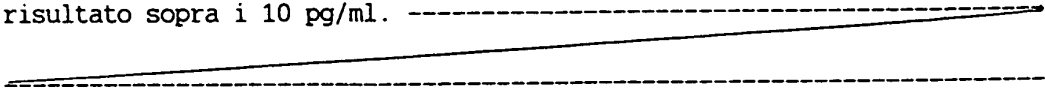
hGHL: GTGCAGTTCCTCAGGAGTGT; hGHR: CGAACTTGCTGTAGGTCTGC. Il prodotto

dell'amplificazione è lungo 171 paia di basi. Le condizioni di amplificazione (35 cicli) sono: 94°C per 20 sec, 58°C per 30 sec e 72°C per 20 sec.

Maschi e femmine eterozigoti sono stati incrociati e la progenie omozigote è stata identificata per Southern blot, sulla base dell'intensità delle bande transgeniche; la loro omozigoticità è stata confermata controllando la prole quando il maschio omozigote è stato accoppiato a un partner non transgenico. I topi usati per gli esperimenti in vivo e in vitro sono sempre stati derivati da un maschio omozigote per il transgene accoppiato con una femmina CD-1 non transgenica. L'RNA totale è stato estratto da diversi tessuti (fegato, milza, polmone, rene, sangue) di topi transgenici e di controllo, secondo tecniche classiche (Sambrook et al., "Molecular cloning: a laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). I Southern e i Northern blot sono stati eseguiti secondo tecniche standard.

Per valutare il valore basale dell'espressione non indotta del transgene, i topi sono stati analizzati per Northern blot e con RT-PCR.

Nessuna espressione è stata rilevata nel polmone, nel rene, nella milza, nel fegato e nei linfociti di sangue periferico di animali non trattati o non esposti a shock termico. Il livello di hGH nei topi non trattati (controllo) è generalmente al di sotto dei limiti di sensibilità del test, e nei casi in cui è stato rilevato, non è mai risultato sopra i 10 pg/ml.



ESEMPIO 2

- Trattamento in vivo con shock termico.

Otto topi transgenici ottenuti secondo quanto detto nell'esempio 1 e quattro topi di controllo non-transgenici sono stati sottoposti a shock termico in vivo a 44°C per 30 min. Inoltre sono stati testati sei ulteriori topi transgenici non trattati. Aliquote di sangue sono state prelevate prima e 1, 3, 5, 7 e 24 ore dopo lo shock termico.

Nei topi transgenici (Fig. 2) è stato rilevato uno specifico aumento nell'hGH plasmatico, con un picco a 3 ore dopo il trattamento.

Questi risultati suggeriscono che il transgene integrato mantiene il modello di espressione inducibile normalmente conferito dal promotore hsp in vivo.

ESEMPIO 3

- Induzione dell'espressione del transgene hsp 70/hGH in vivo da parte del sodio arsenito.

Topi maschi transgenici ottenuti come descritto nell'esempio 1 sono stati pesati, anestetizzati con etere e iniettati intraperitonealmente (i.p.) con NaAsO₂ sciolto in PBS (soluzione salina in tampone fosfato), in quantità finali di 2,5 o 5 mg/kg. I topi transgenici di controllo sono stati iniettati con lo stesso volume di PBS (circa 200 µl per topo).

I campioni di sangue sono stati raccolti prima dell'iniezione e 1, 3, 5, 7 e 24 ore dopo il trattamento.

I livelli plasmatici di hGH ai diversi intervalli di tempo e per le due dosi testate sono mostrati in Fig. 3.

Con entrambe le quantità, si è osservata una risposta chiara statisticamente significativa.

La risposta ha raggiunto il picco dopo 3-5 ore ed è tornata al livello basale 24 ore dopo l'iniezione.

ESEMPIO 4

- Induzione dell'espressione del transgene hsp 70/hGH in vivo da parte di cloruro di metilmercurio.

Tre topi maschi transgenici ottenuti come descritto nell'esempio 1 sono stati pesati, anestetizzati con etere e iniettati i.p. con 3,5 mg/kg di CH_3HgCl sciolti in PBS.

I campioni di sangue sono stati raccolti prima dell'iniezione e 1, 3, 5, 7 e 24 ore dopo il trattamento.

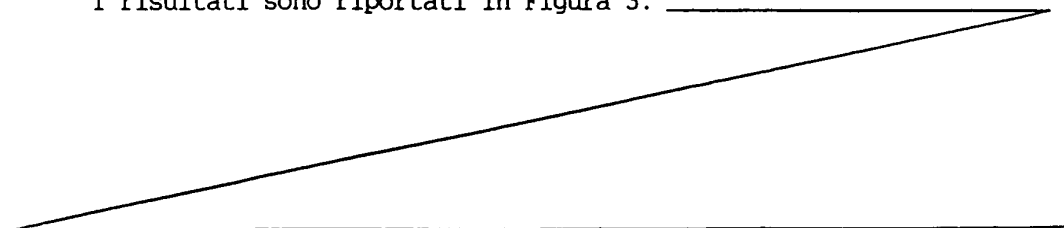
In Fig. 3, sono riportati i livelli plasmatici di hGH misurati ai diversi intervalli di tempo.

L'hGH raggiunge un picco dopo circa 5-7 ore e torna ai valori basali dopo 24 ore dell'iniezione.

ESEMPI 5, 6 e 7

In maniera del tutto analoga a quella descritta negli esempi 3 e 4, è stata valutata l'induzione di hGH in topi trattati con cloruro di rubidio (18,5 mg/kg, esempio 5), rame solfato (9 mg/kg, esempio 6), cloruro di cadmio (4,7 mg/kg, esempio 7).

I risultati sono riportati in Figura 3.



ESEMPIO 8

- Induzione dell'espressione del transgene hsp 70/hGH in vivo dopo somministrazioni ripetute di tossici chimici.

Un totale di 13 topi sono stati trattati inizialmente come segue:

5 topi con As, 3 topi con Cd, 2 topi con Rb, 3 topi con Cu. A distanza di tempo 10 gg - 2 mesi, sono stati reinoculati con As i primi 3 gruppi e con Cu l'ultimo gruppo.

I campioni di sangue sono stati prelevati prima e a 3 e 5 ore dopo l'iniezione, cioè ai tempi di massima risposta.

Come mostrato in Fig. 4, dopo la prima somministrazione di composto, i topi hanno dato una risposta comparabile a quella osservata nei gruppi di topi trattati come negli esempi da 3 a 7.

Quando ritestati dopo 10 - 60 giorni, si è osservato un incremento di hGH dello stesso ordine di grandezza.

ESEMPIO 9

- Prove di tossicità in vitro su colture primarie di fibroblasti embrionali.

Topi transgenici omozigoti ottenuti secondo quanto descritto nell'esempio 1 sono stati incrociati con femmine CD-1. Dopo 14 giorni, i fibroblasti embrionali (EMFIS) sono stati prelevati dai feti secondo le tecniche descritte in Robertson E.J., IRL Press, Oxford, 77-88, 1987.

Le cellule sono state coltivate in terreno DMEM con aggiunta di 10% FCS e antibiotici (pen/strep), in incubatore (5% CO₂, umidità 100%). Il



terreno di coltura è stato cambiato ogni secondo giorno con terreno fresco pre-riscaldato (37°C). Le cellule sono state espanse con due passaggi e poi congelate a -80°C.

In ciascun esperimento, le cellule sono state scongelate, piastrate in piastre di Petri di 10 cm, lasciate crescere e poi riseminate in piastre da 12 pozzetti fino alla confluenza.

Per valutare l'effetto tossico dei composti, il mezzo di coltura delle cellule è stato sostituito con terreno fresco senza siero, pre-riscaldato, contenente i composti tossici alle concentrazioni finali scelte.

Le cellule dunque sono rimaste esposte per 5 o 24 ore a svariati composti inorganici, poi il terreno è stato sostituito con terreno fresco di controllo per oltre 24 ore. Alla fine del trattamento, i mezzi di coltura sono stati raccolti e la secrezione di hGH è stata esaminata con saggio immunoenzimatico.

Ciascun trattamento è stato condotto in triplo e la determinazione di hGH è stata ripetuta due volte per ciascuna piastra.

I risultati sono espressi come pg di hGH/10⁶ cellule.

La sensibilità del metodo è di circa 2-4 pg/ml.

Come mostrato in Tabella, il calcio e il rubidio, noti per non essere tossici alle concentrazioni provate, non inducono alcun rilascio di hGH nel mezzo di coltura.

Un significativo rilascio viene invece indotto dall'esposizione al cromo dopo 24 ore, mentre il rame induce una risposta inferiore dopo 24 ore alle massime concentrazioni.

Al contrario, il mercurio non induce rilascio di hGH da fibroblasti a nessuna concentrazione.

L'arsenico e il cadmio come prevedibile si sono mostrati chiaramente tossici.

ESEMPIO 10

- Prove di tossicità in vitro su colture primarie di epatociti.

Topi maschi transgenici di 8 settimane sono stati anestetizzati e il loro fegato è stato perfuso come descritto in Clerici et al., Mut. Res., 227: 47-51, 1989, per ottenere gli epatociti. Gli epatociti sono stati poi seminati su piastre da 24 pozzetti (2×10^5 cellule/pozzetto) e coltivati nel mezzo William's E addizionato di antibiotici (pen/strep) e di 10% FCS per due ore, in modo da permettere loro di aderire al fondo delle piastre di Petri. Il surnatante è stato rimosso e le cellule aderenti trattate con i composti disciolti nel mezzo.

Per valutare l'effetto tossico dei composti, il mezzo di coltura delle cellule è stato sostituito con terreno fresco senza siero, preriscaldato, contenente i composti tossici alle concentrazioni finali scelte.

Come mostrato in tabella, il calcio e il rubidio non indicano rilascio di hGH neppure negli epatociti primari.

Il trattamento con cromo provoca una notevole risposta dopo 24 ore, mentre il trattamento con rame induce rilascio sia dopo 5 che 24 ore a tutte le concentrazioni.

Il mercurio provoca la risposta a concentrazioni superiori a $5-10^{-5}$ M, mentre l'arsenico e il cadmio si dimostrano estremamente tossici.

ESEMPIO 11

- Prove di tossicità in vitro su colture primarie di cellule renali, polmonari e di midollo osseo.

Le cellule renali e polmonari furono raccolte come descritto in Campbell, J. A. et al., "Sister chromatich exchange analysis of mice following in vitro exposure to vinyl carbonate", In vitro Cell. Dev. Biol. 22: 443:448, 1986).

Brevemente, i reni furono asportati dagli animali soggetti a perfusione epatica, lavati 3 volte in PBS contenente antibiotici e sminuzzati in pezzi di 0,5 mm con un bisturi sterile.

Dopo incubazione di due ore in soluzione tripsina/collagenasi (100 U/(ml), la sospensione fu centrifugata due volte x 5 minuti a 50 x g, piastrata in piastre Falcon da 100 mm e coltivata nel terreno McCoy's con 20% FCS, 2 mM glutammina e Pen/strep.

Per raccogliere le cellule polmonari, venne aperta la cavità toracica per accedere ai polmoni.

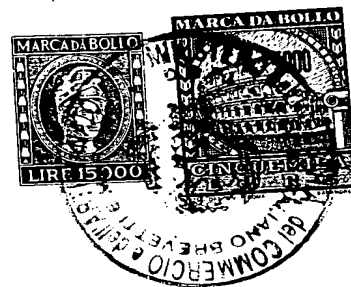
La trachea venne tagliata con bisturi e venne inserito un catetere misura 22 per attuare una perfusione dei polmoni con soluzione di tripsina/collagenesi per 5 min., per aiutare la disaggregazione del tessuto. Le cellule furono quindi tripsinizzate, seminate in 24 pozzetti e lasciate crescere fino a confluenza in terreno McCoy' con 20% FCS, glutammina 2 mM e antibiotici.

Per preparare le colture primarie di cellule di midollo osseo, le ultime furono aspirate dalle cavità di femore e tibia con una siringa contenente il mezzo di coltura.

Le cellule furono piastrate in piastre da 12 pozzetti con il terreno McCoy' con 20% FCS, 2 mM glutammina e antibiotici, e lasciate crescere fino a che le cellule dello stroma arrivarono a confluenza.

Per valutare l'effetto tossico dei composti, si è proceduto come negli esempi 9 e 10 descritti in precedenza.

I risultati sono riportati in Tabella. -----



Tabella

(A) Determinazione del rilascio di hGH (pg/10⁶ cellule) e vitalità di colture primarie transgeniche dopo 5 ore di trattamento

C mposti °	Linee primarie	rilascio di hGH				Vitalità			
		10-5M	5 x10-5M	10 -4M	5 x 10-4 M	10-5M	5 x10-5M	10 -4M	5 x 10-4 M
Epatociti	CaCl ₂	nd	nd	nd	nd	+	+	+	+
	RbCl	nd	nd	nd	nd	+	+	+	+
	CrCl ₃	/	nd	nd	nd	/	+	+	+
	CuSO ₄	/	nd	80	66	/	+	+	+
	K ₂ Cr ₂ O ₇	nd	65	94	68	+/-	+/-	-	-
	CH ₃ HgCl	nd	nd	nd	/	+/-	+/-	-	/
	CdCl ₂	309	452	57	14	+/-	+/-	-	-
	NaAsO ₂	100	224	nd	/	+	+/-	-	/
Fibroblasti embrionali	CaCl ₂	/	nd	nd	nd	/	+	+	+
	RbCl	/	nd	nd	nd	/	+	+	+
	CrCl ₃	/	nd	nd	nd	/	+	+	+
	CuSO ₄	/	nd	6	12	/	+	+	+
	K ₂ Cr ₂ O ₇	9	nd	nd	nd	+/-	+/-	-	-
	CH ₃ HgCl	/	nd	nd	nd	/	+/-	-	/
	CdCl ₂	250	85	45	nd	+/-	+/-	-	-
	NaAsO ₂	nd	113	19	nd	+	+/-	+/-	/

- continua -

- continua -

CaCl2	Cellule di	/	nd	nd	nd	/	+	+	+
RbCl	rene	/	nd	nd	57	/	+	+	+
CrCl3		/	15	nd	nd	/	+	+	+/-
CuSO4		/	nd	nd	nd	/	+	+/-	+/-
K2Cr2O7		nd	nd	nd	nd	+/-	+/-	+/-	/
CH3HgCl		10	nd	nd	nd	+/-	+/-	+/-	/
CdCl2		nd	nd	nd	nd	+/-	-	-	/
NaAsO2		22	17	28	nd	+	+/-	-	/
CaCl2	Cellule di	/	127	202	nd	/	+	+	+
RbCl	polmone	/	191	71	28	/	+	+	+
CrCl3		/	122	166	92	/	+	+	+
CuSO4		/	nd	184	nd	/	+/-	+/-	+/-
K2Cr2O7		nd	nd	nd	nd	+/-	-	-	/
CH3HgCl		27	nd	nd	nd	-	-	-	/
CdCl2		nd	11	nd	31	+/-	-	-	/
NaAsO2		nd	249	nd	37	+/-	+/-	-	/
						+/-	+/-	-	/

° I livelli di hGH nel medio di cellule non trattate (controlli) non erano misurabili dopo 5+24 ore di incubazione

nd = non detettabile, / = not determinato; + = 100% vitali; +/- = 30-70% vitali; - = 100% morte

(B) Determinazione del rilascio di hGH (pg/10⁶ cellule) e vitalità di colture primarie transgeniche dopo 24 ore di trattamento

		rilascio di hGH					Vitalità			
C mposti °	Linee primarie	10-5M	5 x10-5M	10 -4M	5 x 10-4 M	10-5M	5 x10-5M	10 -4M	5 x 10-4 M	
Epatociti										
CaCl2		nd	nd	nd	nd	+	+	+	+	
RbCl		nd	nd	nd	nd	+	+	+	+	
CrCl3		/	36	20	nd	/	+	+	-	
CuSO4		/	12	61	100	/	+	+	+/-	
K2Cr2O7		nd	nd	nd	nd	-	-	-	-	
CH3HgCl		nd	63	103	/	+/-	-	-	/	
CdCl2		nd	nd	17	21	+/-	+/-	-	-	
NaAsO2		270	19	5	/	+	+/-	-	/	
Fibroblasti embrionali										
CaCl2		/	nd	nd	nd	/	+	+	+	
RbCl		/	nd	nd	nd	/	+	+	+	
CrCl3		/	8	10	6	/	+	+	+	
CuSO4		/	nd	10	47	/	+	+	+	
K2Cr2O7		nd	nd	nd	nd	+/-	-	-	-	
CH3HgCl		/	nd	nd	nd	/	-	-	-	
CdCl2		181	108	41	nd	-	-	-	-	
NaAsO2		19	380	37	4	+/-	+/-	-	-	

- continua -

- continua -

CaCl2	Cellule di	/	nd	nd	/	+	+	+
RbCl	rene	/	nd	nd	/	+	+	+
CrCl3		/	nd	nd	/	+	+	+/-
CuSO4		/	nd	nd	/	+/-	+/-	-
K2Cr2O7		nd	nd	nd	-	-	-	/
CH3HgCl		nd	nd	nd	-	-	-	/
CdCl2		nd	81	110	+/-	-	-	/
NaAsO2		300	nd	40	+	+/-	-	/

CaCl2	Cellule di	/	nd	nd	/	+	+	+/-
RbCl	polmone	/	20	110	/	+	+	+/-
CrCl3		/	200	199	/	+/-	+/-	+/-
CuSO4		/	81	132	/	+/-	+/-	-
K2Cr2O7		13	92	nd	-	-	-	/
CH3HgCl		nd	164	nd	-	-	-	/
CdCl2		64	196	415	+/-	-	-	/
NaAsO2		20	55	nd	+/-	-	-	/

CaCl2	Cellule di	/	nd	51	nd	+	+	+
RbCl	midollo osseo	/	nd	20	128	+	+	+
CrCl3		/	nd	21	21	+	+	+
CuSO4		/	nd	127	145	+	+	+
K2Cr2O7		nd	38	127	/	-	-	-
CH3HgCl		nd	42	165	/	-	-	-
CdCl2		61	18	nd	/	+/-	+/-	-
NaAsO2		nd	nd	nd	/	+/-	+/-	+/-

o I livelli di hGH nel medio di cellule non trattate (controlli) non erano misurabili dopo 24 ore di incubazione

nd = non determinabile, / = not determinato; + = 100% vitali; +/- = 30-70% vitali; - = 100% morte



RIVENDICAZIONI

1. Animale transgenico non umano comprendente cellule contenenti un costrutto costituito da una sequenza regolatrice sensibile a uno stress collegata alla sequenza di un gene "reporter".
2. Animale secondo la rivendicazione 1 che è un mammifero.
3. Animale secondo le rivendicazioni 1-2 che è un roditore.
4. Animale secondo le rivendicazioni 1-3 che è un topo.
5. Animale secondo le rivendicazioni 1-4, in cui detta sequenza regolatrice è il promotore delle "heat shock proteins" (hsp).
6. Animale secondo la rivendicazione 4, in cui detta sequenza è il promotore umano della hsp 70.
7. Animale secondo le rivendicazioni 1-6, in cui detto gene "reporter" è il gene per l'ormone della crescita.
8. Colture cellulari primarie ottenute dall'animale transgenico delle rivendicazioni 1-7 recanti un costrutto costituito da una sequenza regolatrice sensibile a uno stress collegata alla sequenza di un gene "reporter".
9. Colture cellulari primarie secondo la rivendicazione 8, di fibroblasti, epatociti, cellule renali, polmonari e di midollo osseo.
10. Metodo per lo studio della tossicità di agenti chimici, fisici o biologici comprendente:
 - a) l'esposizione dell'animale transgenico delle rivendicazioni 1-7 all'agente tossico;
 - b) la rilevazione dell'effetto tramite l'espressione del gene "reporter".

11. Metodo secondo la rivendicazione 10, in cui lo stesso animale viene impiegato per prove di tossicità ripetute con lo stesso o con diverso agente tossico.
12. Metodo secondo le rivendicazioni 10-11, per lo studio della cinetica di tossicità di uno o più agenti tossici.
13. Metodo secondo le rivendicazioni 10-12 per lo studio dello stress termico.
14. Metodo secondo le rivendicazioni 10-12 per lo studio della tossicità di metalli.
15. Metodo secondo la rivendicazione 14 per lo studio della tossicità di metalli scelti dal gruppo comprendente Rb, Cu, Hg, As e Cd.
16. Metodo per lo studio della tossicità di agenti chimici, fisici o biologici comprendente:
 - a) la preparazione di colture cellulari primarie ottenute dall'animale transgenico delle rivendicazioni 1-7 recanti un costrutto costituito da una sequenza regolatrice sensibile a uno stress collegata alla sequenza di un gene "reporter".
 - b) l'esposizione delle colture cellulari primarie all'agente tossico;
 - c) la rilevazione dell'effetto tramite l'espressione del gene "reporter" nel mezzo di coltura.
17. Metodo secondo la rivendicazione 16, in cui vengono impiegate colture primarie di fibroblasti ed epatociti.
18. Metodo secondo le rivendicazioni 16-17 per lo studio della tossicità da metalli.
19. Metodo secondo la rivendicazione 18 in cui detti metalli sono scelti

dal gruppo comprendente Rb, Cr, Cu, Hg, As e Cd.

20. Uso dell'animale transgenico della rivendicazione 1 per studi di tossicità in vivo.

21. Uso di un animale transgenico secondo la rivendicazione 19, in cui detto animale è un topo.

22. Uso di colture primarie di cellule dell'animale transgenico della rivendicazione 1 per studi di tossicità in vitro.

Milano, 28 agosto 1997

Il Mandatario
(Minoja Fabrizio)
dello Studio Consulenza Brevettuale s.r.l.

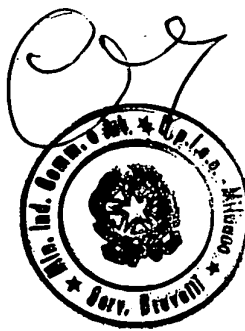
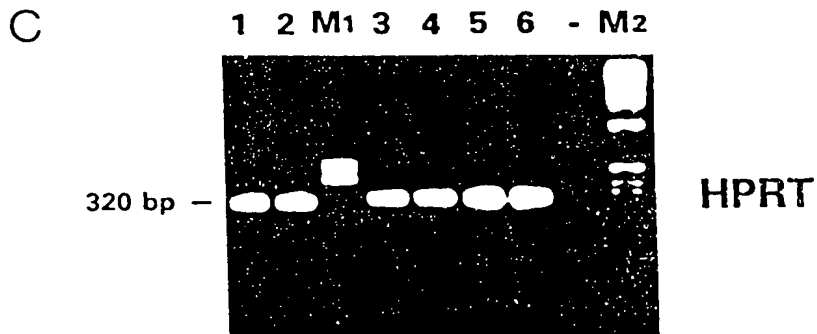
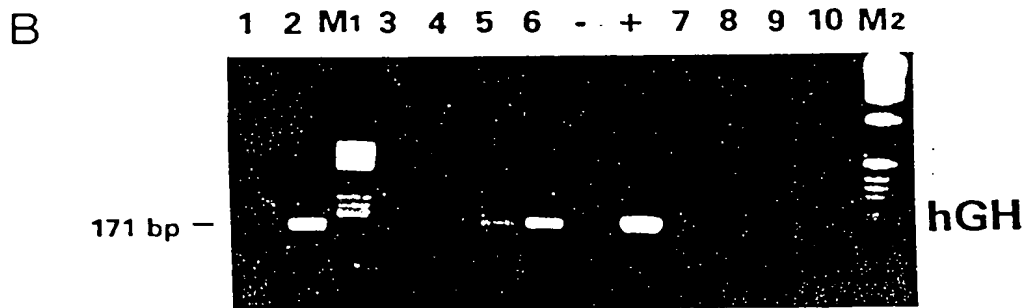
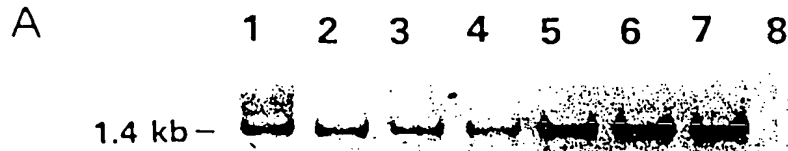


FIGURA 1 MI 97 A 1972



Il Mandatario
(Minoja Fabrizio)
dello Studio Consulenza Brevettuale s.r.l.

F. Minoja

MI 97 A 1972

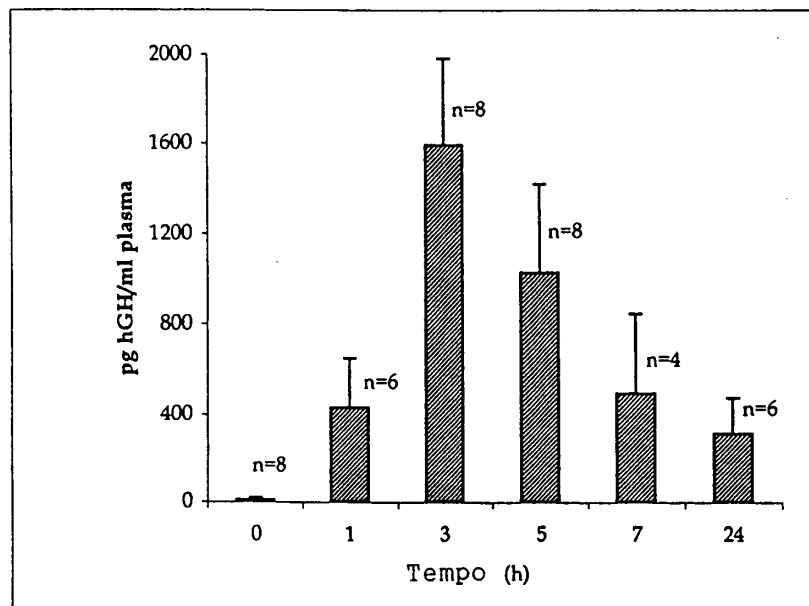


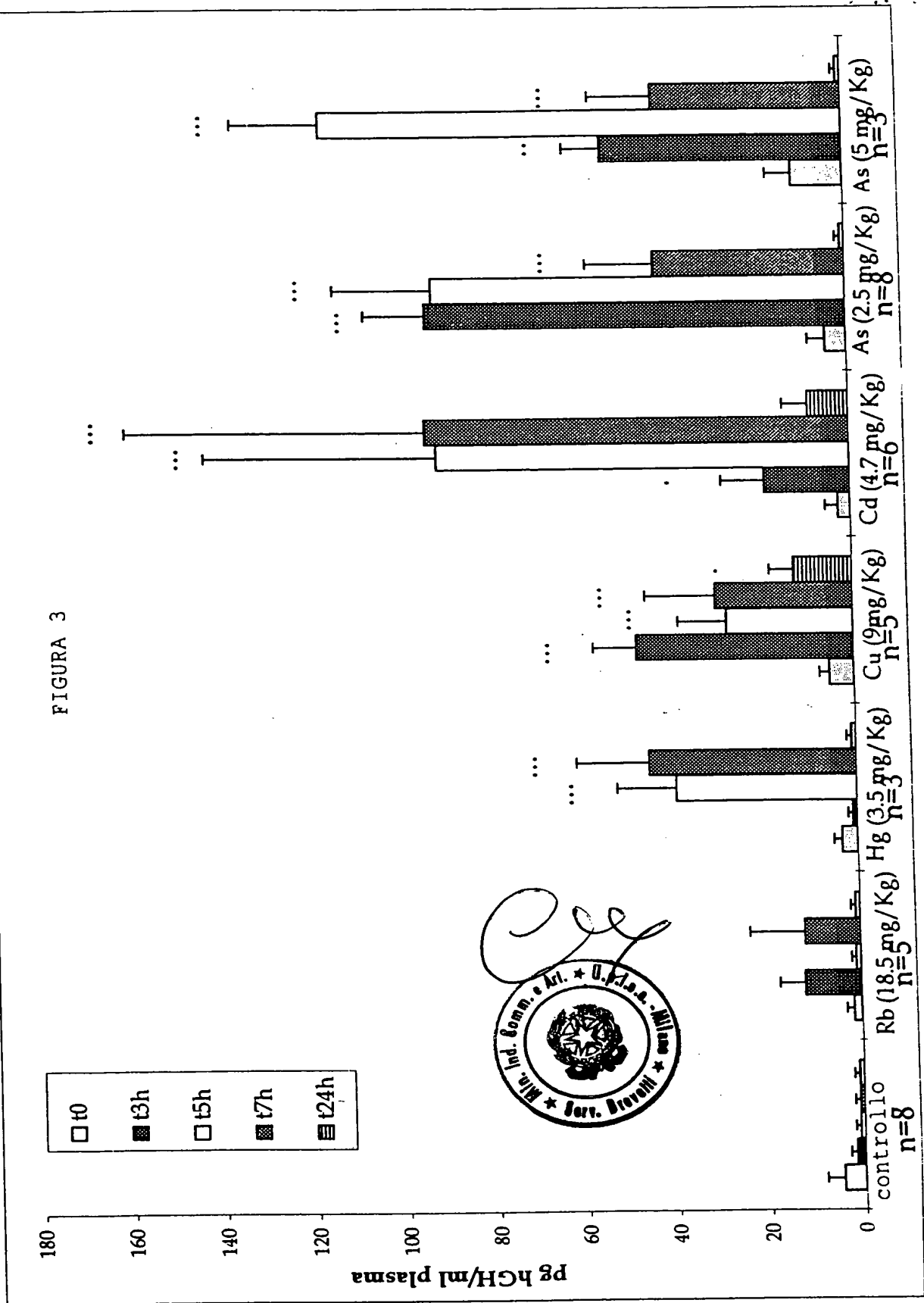
FIGURA 2

Il Mandatario
(Minoja Fabrizio)
dello Studio Consulenza Brevettuale s.r.l.

F. Minoja



FIGURA 3



Il Mandatario
(Minoja Fabrizio)
dello Studio Consulenza Brevettual s.r.l.

F. Minoja

MI 97 A 1972

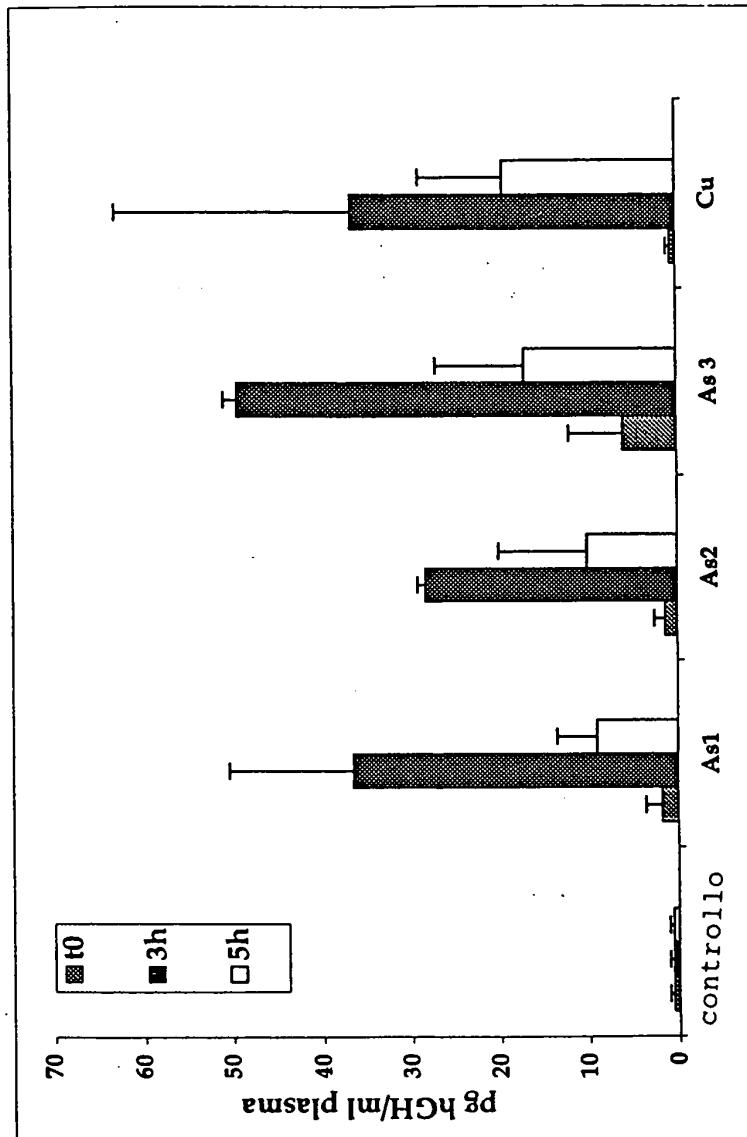


FIGURA 4

Il Mandatario
(Minoja Fabrizio)
dello Studio Consulenza Brevettuale s.r.l.

Fabrizio



THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)